



関西学院大学リポジトリ

Kwansei Gakuin University Repository

海洋性珪藻及びサンゴ共生褐虫藻の新規形質転換系の確立に向けた選抜条件の検証

著者	松江 駿
発行年	2017
URL	http://hdl.handle.net/10236/00027163

海洋性珪藻及びサンゴ共生褐虫藻の

新規形質転換系の確立に向けた選抜条件の検証

関西学院大学大学院理工学研究科

生命科学専攻 松田研究室 松江 駿

本論文は和文頁 331、図 9、表 4 より構成され、末尾に参考文献 37 編が記載されている。

海洋性珪藻は地球の一次生産の約 20%を担っている重要な一次生産者である。一方、褐虫藻はサンゴと相利共生を行っており、熱帯の貧栄養域の主要生産者として知られる。サンゴは褐虫藻から受け渡された有機物の一部を利用して生育し、ほとんどの有機物は海洋へと放出する。多くの従属栄養生物がサンゴの放出する有機物に依存している。そのため、サンゴ礁は海洋表面の 0.1%しか占めていないにもかかわらず、海洋生物種の約 40%が生育しており、多様性維持に寄与している。このように海洋性珪藻と褐虫藻は共に海洋において重要な役割を担っており、その生理機構の詳細は海洋の物質循環や、生態系の動態を理解するうえで重要である。ゲノム解読が律速とならない昨今、形質転換技術の確立は、新分野開拓の最重要ステップである。ピリミジン塩基生合成経路の最初の二反応を触媒する酵素 Uridine-5-monophosphate synthase (UMPS) 遺伝子の機能欠損体は、ウラシル要求性を示し、オロト酸アナログ体である 5-Fuoroorotic acid (5-FOA) に対して耐性となる。この変異表現型やこの変異からの復帰表現型は、UMPS 機能による突然変異選択マーカーとして利用することが出来る。先行研究では、羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* において、この UMPS をマーカー系が確立された。本研究では、褐虫藻 *Symbiodinium minutum* において UMPS マーカー系の確立を目指すと共に、珪藻および褐虫藻においてトリプトファン要求性選抜マーカー系や抗生物質選抜マーカー系の確立もめざした。褐虫藻において、多くの海洋微生物の生育に用いられている F/2ASW 培地を用い、個体培地の場合は 0.8%濃度の寒天を添加することで培養することを決定した。次に、培養条件が決定したので、栄養要求性株を選抜するための各アナログ体濃度の検討を行った結果、*P. tricornutum* において 1.0 mg L^{-1} 5-FAA + 50 mg L^{-1} tryptophan、褐虫藻 *S. minutum* において 20 mg L^{-1} 5-FOA + 50 mg L^{-1} uracil 及び 20 mg L^{-1} 5-FAA + 50 mg L^{-1} 可能であることが示唆された。これらの培養条件の培地を用いて、約 1.4×10^8 個の細胞の塗布を行ったが耐性株を得ることができなかった。これらの選抜系のほかに、多くの海洋微生物の選抜に用いられ耐性遺伝子が明らかになっている抗生物質 Zeocin™ 及び Nourseothricin を用いた選抜が可能であるか検証したが、それぞれ生育阻害は見られず、利用には不向きであることが示唆された。